

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-191622

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)8月26日

A 61 K 45/02
C 07 K 15/087252-4C
6464-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑬ 発明の名称 γ -グロブリンの加熱処理方法

⑭ 特 願 昭60-33335

⑮ 出 願 昭60(1985)2月21日

| | | | |
|---------|------|-------|---------------------|
| ⑯ 発 明 者 | 平 尾 | 豊 | 豊中市寺内2-14-1 606号 |
| ⑯ 発 明 者 | 瓜 生 | 勝 寛 | 桜井市大福中津道3丁目601-32 |
| ⑯ 発 明 者 | 上 村 | 八 尋 | 枚方市三矢町5-18 メゾン枚方215 |
| ⑰ 出 願 人 | 株式会社 | ミドリ十字 | 大阪市東区今橋1丁目15番地の1 |
| ⑱ 代 理 人 | 弁理士 | 高 島 一 | |

明 細 書

(産業上の利用分野)

1. 発明の名称

 γ -グロブリンの加熱処理方法

本発明は、 γ -グロブリン含有水溶液の加熱処理方法に関する。

2. 特許請求の範囲

(1) γ -グロブリン含有水溶液に対して、単糖類、二糖類、糖アルコール類から選ばれた少なくとも一種の主安定化剤の存在下に加熱処理をすることを特徴とする γ -グロブリン含有水溶液の加熱処理方法。

(2) 主安定化剤の添加量が、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり、10~100gである特許請求の範囲第(1)項記載の加熱処理方法。

(3) 加熱処理が、60℃、10時間処理である特許請求の範囲第(1)項記載の加熱処理方法。

(4) 主安定化剤に加えて、中性アミノ酸、中性塩、炭素原子数3~10の有機カルボン酸塩、界面活性剤より選ばれた少なくとも一種の補助安定化剤を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の加熱処理方法。

3. 発明の詳細な説明

更に詳しくは、 γ -グロブリンに選ばれた安定化剤を添加し、低温殺菌(60℃、10時間)した場合、重合体の増加、抗補体価の上昇を認めない安定な γ -グロブリン加熱処理方法に関する。

(従来の技術)

血漿蛋白成分である免疫グロブリンの内、特にIgGを主成分とする γ -グロブリン製剤は、これまで広く各種感染症の予防並びに治療に役立てられてきたが、熱安定性に欠けること、多種ウィルス、細菌等の抗体を広く含有している等の理由で加熱殺菌は施されていない。

しかし、 γ -グロブリンを血漿蛋白の分画から得る場合には、肝炎ウィルス等の夾雑ウィルスの混在を100%否定することはできない。そのため、夾雑ウィルスの不活化方法として、血液製剤化技術において広く認められている60℃、10時間の加熱処理が施されていることが極めて重要

である。

しかし、通常の生理的食塩溶液等の水溶液中でこれを行うと短時間で白濁し、大部分の活性を失い、蛋白分子が変性してしまう。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者らは、種々検討を重ね、 γ -グロブリンを含有する水溶液に対して、肝炎ウィルスを不活化するための加熱処理を行うに際して、単糖類、二糖類および糖アルコールから選ばれる少なくとも一種(これらを主安定化剤と総称する)を添加すれば加熱処理に対する γ -グロブリンの熱安定性が著しく高まることを見出すと共に上記主安定化剤に加えてさらに中性アミノ酸、中性塩、界面活性剤、有機カルボン酸塩から選ばれる少なくとも一種を共存させることによって γ -グロブリンの熱安定性がより一層高められることを見出し、本発明を完成した。

また、本発明の方法で加熱処理することにより γ -グロブリン水溶液中に含まれる γ -グロブリンの重合体を単量体に解離させることもできる。

本発明で使用される補助安定化剤に関して、中性塩としては塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属のハロゲン酸塩などが例示され、添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり0.1～10gである。

中性アミノ酸(即ち、モノアミノモノカルボン酸)としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンなどが例示され、添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり1～20gである。

有機カルボン酸としては、炭化水素残基にカルボキシル基が置換したものをいい、炭化水素残基は飽和されていても不飽和であってもよく、また鎖状(直鎖状または分枝状)、環状のいずれでもよい。当該炭化水素残基としてはアルキル基、アリール基(たとえばフェニル基)などが例示される。当該有機カルボン酸におけるカルボキシル基は複数個であってもよいが、1および2個が好ましい。また当該有機カルボン酸は、水酸基で置換

本発明における γ -グロブリン含有水溶液としては、 γ -グロブリンを含む未精製な水溶液から精製された水溶液までいかなる段階の γ -グロブリン水溶液であってもよいが、有利には部分精製または精製段階の水溶液が加熱処理の対象とされる。その蛋白質(γ -グロブリン)の含量は0.1～30%(w/v)のものが好ましい。また、当該水溶液のpHは一般にpH4.5～10であり、好ましくは適当な緩衝液によってpH6～8に調整されることが好ましい。

γ -グロブリン含有水溶液に加えられる主安定化剤に関して、単糖類としてはグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などが、二糖類としてはショ糖、麦芽糖、乳糖などが、糖アルコールとしてはマンニット、ソルビット、キシリットなどが好適なものとして例示されるが、これらに限定されるものではない。当該主安定化剤の添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり10～100gである。

されていてもよい。有機カルボン酸塩における塩としては、生理的に許容されるものであれば特に制限はなく、好ましいものとしては、アルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩など)、アルカリ土類金属塩(カルシウム塩など)、特に好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩があげられる。

有機カルボン酸塩の具体例としては、プロパン酸、ブタン酸、ペンタン酸、カブリン酸、カブロン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、クエン酸、マンデル酸などの生理的に許容される塩、特にアルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩)があげられる。

かかる有機酸の好ましい炭素数は、3～15程度である。

有機カルボン酸塩の添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり1～30gである。

界面活性剤としては、アルキルフェニルポリオキシエチレン(例えばトリトン登録商標(Triton®)及びノニデット登録商標(Nonidet®))のような非イオン性剤、胆汁酸塩(例えばナトリウムタ

ウロコラート)のようなアニオン性剤、又ベンズアルコニウムクロライドのようなカチオン性剤、プロビレンオキシドの高分子量共重合体のような界面活性を持つ多価アルコール(プルロニック登録商標(Pluronic®) F68)などが例示され、その添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり0.002~0.05g程度が好ましい。

加熱処理は、夾雑ウィルスを不活化するのに十分な温度および時間行えばよく、たとえば50℃~70℃、好ましくは約60℃にて5~20時間、好ましくは10時間行われる。

本発明の加熱効果を検討するため、 γ -グロブリン製剤に含まれる可能性が危惧される各種ウィルスの感染性について、安定化剤の添加による加熱効果、安定化剤の無添加による加熱効果を実験した。この実験は、 γ -グロブリン試料に痘瘡ウィルス、おたふくかぜウィルス、はしかウィルス、水泡性口内炎ウィルス、チタングニアウィルス、ポリオウィルス、コクサツキウィルス、エコーウィルスを加え、60℃で10時間の加熱処理を乾燥製剤としてもよい。

当該処理を経た γ -グロブリンは、そのまま、または自体公知の製剤化処理を行って、例えば注射用蒸留水で希釈又は溶解して投与される。投与量は、通常、成人に対しては1回に γ -グロブリンとして、500~3000mg量、小児に対しては、1回に γ -グロブリンとして、250~1500mg量が使用される。

試験方法：

外観性状としては、濁りが問題となることからO.D._{500nm}の吸光度を測定した。

重合体の定量は高速液体クロマトグラフィーで分析した。

抗補体価の測定は、カバットとマイヤーの方法(Experiemental Immunochimistry), 225, (1961))及び西岡、岡田の方法(免疫の生化学, 103, 昭46(共立出版))の方法に準じた。すなわち、100単位の補体が試料を加えることによって何単位に減少するかを測定し、その減少単位を抗補体価として

行い、経時的に残存するウィルス感染性を測定したが、10時間後には安定化剤の添加、不添加に係わらず、感染性を完全に失っていた。この結果は用いたウィルス以外のウィルスについても本発明の加熱処理が施されるならば感染性は失活させることを示唆するものである。

本発明は上記加熱処理を行った後、外観、性状はもとより、重合体の定量、抗補体価の測定、麻疹抗体価の測定および急性毒性実験を行い、 γ -グロブリン製剤として医療上極めて安全性の高いまた、有効性の高いものといえる。

かくして得られた製剤は、溶液状であり、高度精製 γ -グロブリンを出発材料とした場合はそのまま、粗製品を用いた場合は公知の精製法に準じて処理を行った後、必要ならば、透析、除菌濾過を行った後、包装単位に従って500~10,000mgの γ -グロブリンを含むように分注される。貯蔵方法としては、高温を避ければ特に限定されるものではないが、特に望ましくは、30℃以下に保存することであるが、また、これは所望により凍結

表わした。

麻疹抗体価はヘマグルチネーション インヒビション テスト(Hemagglutination Inhibition test)法により測定し、国際単位(IU/150mg)で表わした。

実施例1

本発明による安定化効果を確認するための実験を行った。実験には重合体を約30%含む γ -グロブリンを5%濃度に調整して行った。各種主安定化剤を添加後(添加量は表中に明記)、60℃、10時間の加熱処理を行い、溶液の濁り(O.D._{500nm})、重合体の定量および抗補体価を調べた。この結果、安定化剤を添加することによって γ -グロブリンの加熱安定性は増大した(表1)。

また、重合体特に2量体の低下が確認された。

(以下余白)

実施例 2

重合体を約20%含む γ -グロブリン溶液に各種濃度にグルコースを添加、 γ -グロブリン濃度を5%に調整したものにつき60℃加熱処理を行い、経時的に0.0...nm値、重合体定量、抗補体価、麻疹抗体価等の測定を行った。

グルコースを含まない系は、1時間以内に白濁し、変性していることが見られるのに対し、グルコースを加えた系は、加えた量が増すに伴い γ -グロブリンの安定性が高まった。100gグルコース添加の系では60℃、10時間加熱においても全く白濁せず、麻疹抗体価の減少も見られなかった。しかもダイマーもわずか10%に低下し、抗補体価も19単位と低下した(表2)。

(以下余白)

表 1

| 安定化剤 | 添加量 ^{※1} | 0.0...nm | 重合体(%) | | 抗補体価(単位) |
|---------|-------------------|----------|-----------------|------|----------|
| | | | ダイマー | ポリマー | |
| コントロール | (加熱前) | 0.024 | 33 | 2 | 54 |
| 無添加(対照) | | 白濁 | — ^{※2} | — | — |
| グルコース | 50 | 0.010 | 15 | 2 | 38 |
| ショ糖 | 50 | 0.012 | 13 | 2 | 36 |
| マンニット | 20 | 0.017 | 17 | 2 | 42 |

^{※1}: γ -グロブリンの5w/v%溶液100ml当たりの添加量(g)
^{※2}: 測定不可能

表 2 (60℃、10時間加熱処理)

| グルコース添加量(g) | 0.0...nm | 重合体(%) | | 抗補体価(単位) | 麻疹抗体価(1U) |
|-------------|----------|-----------------|------|----------|-----------|
| | | ダイマー | ポリマー | | |
| コントロール(加熱前) | 0.024 | 22 | 3 | 54 | 42 |
| 無添加 | 白濁 | — ^{※1} | — | — | — |
| 5 | 白濁 | — | — | — | — |
| 25 | 0.040 | 15 | 30 | >50 | <10.5 |
| 50 | 0.010 | 13 | 3 | 36 | 21 |
| 75 | 0.004 | 12 | 2 | 28 | 40 |
| 100 | 0.004 | 10 | 2 | 19 | 40 |

^{※1}: 測定不可能

実施例 3

主安定化剤であるグルコースに補助安定化剤である中性アミノ酸(グリシン)、中性塩(塩化ナトリウム)、有機カルボン酸塩(クエン酸ナトリウム)、界面活性剤(ブルロニック® F68)等を加え、60℃加熱処理における γ -グロブリンの安定性につき調べた。実施例1と同様重合体を約15%含む γ -グロブリン溶液で行った。

グルコース添加量を γ -グロブリン水溶液100ml当たり75gとし、塩化ナトリウム5.8%添加、グリシン5%添加、クエン酸ナトリウム10%添加、ブルロニックF68 0.01%添加および塩化ナトリウム5.8%とブルロニックF68 0.01%両補助安定化剤添加の各系について60℃加熱処理を施した。結果は表3に示す。補助安定化剤を添加することによって重合体および抗補体価をさらに低下させることができた。

(以下余白)

実施例4

安全性試験として急性毒性実験を行った。

実施例3で60℃、10時間加熱処理を施したサンプルA、B、C、D、E、Fにつき無菌生理的食塩水で十分透析した後、マウスの尾静脈から1匹当たり総量0.5mlおよび1.0mlをそれぞれ1群5匹に投与し、7日間観察したが、異常は認められなかった。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字

代理人 弁理士 高 島 一



表 3

| 補助安定化剤 | 添加量 (g) | O.D. 1000 nm | 重合体(%) | | 抗補抗体価 (単位) | 凝縮抗体価 (10) |
|-----------------------|-------------|-----------------|--------|------|---------------|---------------|
| | | | ダイマー | ポリマー | | |
| コントロール | (加熱前) | 0.004 | 15 | 2 | 44 | 42 |
| 無添加 | | 0.004 | 8 | 1 | 28 | 40 |
| 塩化ナトリウム | 5.8 | 0.004 | 5 | 1 | 18 | 42 |
| グリシン | 5 | 0.006 | 8 | 2 | 25 | 45 |
| クエン酸 ナトリウム | 10 | 0.004 | 8 | 1 | 24 | 38 |
| アルロニック F68 | 0.01 | 0.004 | 6 | 1 | 13 | 40 |
| 塩化ナトリウム アルロニック F68 | 5.8 0.01 | 0.004 | 6 | 1 | 12 | 41 |

手 続 補 正 書 (自発)

昭和60年8月1日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第33335号

2. 発明の名称

γ-グロブリンの加熱処理方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

代表者 松 下 廉 蔵

4. 代理人 ⑤541

住所 大阪市東区平野町4丁目53番地3

ニューライフ平野町406号

電話 (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士 (8079) 高 島 一

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書第9頁、第6行の「500~3000」を「2500~5000」に訂正する。

(2) 同書第9頁、第7行の「250~1500mg量」

を「100~150 mg/kg体重」に訂正する。

(3) 同書第14頁、第12行の「アルロニック F68」

を「アルロニック・F68」に訂正する。

(4) 同書第14頁、第13行の「アルロニック F68」

を「アルロニック・F68」に訂正する。

(5) 同書第15頁、表3の

| | | |
|---|-----------------------|---|
| 「 | アルロニック F68 | 」 |
| | 塩化ナトリウム アルロニック F68 | |

を

| | | |
|---|-----------------------|---|
| 「 | アルロニック・F68 | 」 |
| | 塩化ナトリウム アルロニック・F68 | |

に訂正する。

以上

12

EUROPEAN PATENT APPLICATION

21 Application number: 86301196.1

51 Int. Cl.: A 61 L 2/04

22 Date of filing: 20.02.86

30 Priority: 21.02.85 JP 33335/85

43 Date of publication of application:
08.10.86 Bulletin 86/41

64 Designated Contracting States:
BE CH DE FR GB LI NL SE

71 Applicant: THE GREEN CROSS CORPORATION
15-1, Imabashi-1-chome Higashi-ku Osaka-shi
Osaka 541(JP)

72 Inventor: Hirao, Yutaka
14-1-606, Terauchi-2-chome
Toyonaka-shi(JP)

72 Inventor: Uriyu, Katuhiro
601-32, Nakatsumichi-3-chome
Daifuku Sakurai-shi(JP)

72 Inventor: Uemura, Yahiro
Mezon Hirakata 215 5-18, Mitsuyacho
Hirakata-shi(JP)

74 Representative: Harrison, David Christopher et al,
MEWBURN ELLIS & CO 2/3 Cursitor Street
London EC4A 1BQ(GB)

54 Method of virus-inactivating heat treatment of gamma-globulin.

57 A gamma-globulin aqueous solution can be subjected to sterile heat-treatment without losing its activity when the treatment is conducted in the presence of at least one stabilizer which is a monosaccharide, disaccharide or sugar-alcohol added to the solution. The stabilizer serves to decrease the harmful polymer or anticomplement activity of the gamma-globulin before the treatment but to maintain the titer of a wide variety of antibodies to various viruses and bacteria, while the infectivity of viruses possibly contained is completely removed.

An additional stabilizer, which is a neutral amino, a neutral inorganic salt, an organic carboxylic acid salt or a surface active agent, assists the abovementioned stabilizer when used together with it.

EP 0 196 761 A2

METHOD OF VIRUS-INACTIVATING HEAT TREATMENT
OF γ -GLOBULIN

1 This invention relates to a method of the heat
treatment of an aqueous solution containing γ -globulin.
More particularly, it relates to a method of a stable
heat treatment of γ -globulin wherein a selected stabilizer
5 is added to an aqueous solution of γ -globulin and no
increase of the dimer or polymer of γ -globulin nor increase
in anticomplement activity is observed after low tempera-
ture pasteurization, i.e. a treatment conducted at 60°C
for 10 hours.

10 Gamma globulin preparations containing, among
immunoglobulins of a plasma protein component, particularly
IgG as the principal ingredient have been widely used in
the prevention and the treatment of various infectious
diseases. However, they are not subjected to a heat-
15 sterilization for the reason that they have a poor heat
stability and that they contain a wide variety of antibodies
to various viruses and bacteria, of which activity is liable
to be lost.

 However, when γ -globulin is prepared from the
20 fraction of plasma protein, the possibility of contamina-
tion with viruses such as hepatitis viruses cannot be
negated completely. Accordingly, it is important that γ -
globulin preparations are subjected beforehand to a heat
treatment at 60°C for 10 hours, which treatment has been
25 widely recognized in the blood component preparation

1 technology as a method for inactivating contaminating
viruses.

However, when the treatment is conducted in a
conventional aqueous solution such as physiological saline
5 solution, the solution becomes turbid in a short time,
most of the activity being lost and the protein molecules
being denatured.

After extensive studies, the present inventors
have found that the thermal stability of γ -globulin against
10 heat treatment is markedly improved when at least one
member (hereinafter referred to generically as a principal
stabilizer) selected from the group consisting of a mono-
saccharide, a disaccharide, and a sugaralcohol is added
to an aqueous solution containing γ -globulin prior to or at
15 the time of the heat treatment of the solution for inactivating
hepatitis viruses and that the thermal stability of γ -
globulin is further enhanced when at least one member
(hereinafter referred to generically as an auxiliary
stabilizer) selected from the group consisting of a neutral
20 amino acid, a neutral inorganic acid salt, a surface active
agent, and an organic carboxylic acid salt is added to
the solution in addition to the said principal stabilizer.
This invention has been accomplished on the basis of above
findings.

25 Further, the heat treatment according to the
method of this invention make it possible to dissociate
the dimer or polymer of γ -globulin contained in the aqueous
 γ -globulin solution into its monomer.

1 The aqueous solution containing γ -globulin to be
heat-treated according to this invention may be an aqueous
 γ -globulin solution at any stage of purification ranging
from an unpurified aqueous solution containing γ -globulin
5 to a purified aqueous solution. However, an aqueous
solution at a partially purified or purified stage is
advantageously subjected to the heat treatment. The aqueous
solution preferably contains 0.1 to 30% (w/v) of protein
(γ -globulin). The pH of the aqueous solution is preferably
10 generally 4.5 to 10, and more preferably adjusted to pH 6 to
8 with a suitable buffer solution.

As to the principal stabilizers added to the
aqueous solution containing γ -globulin, preferred examples
of a mono-saccharide include glucose, mannose, galactose,
15 and fructose, those of a disaccharide include sucrose,
maltose, and lactose, and those of a sugaralcohol include
mannitol, sorbitol and xylitol, but they are not limited
to these examples. The amount of the principal stabilizer
to be added is preferably 10 to 100 g, more preferably 40 to
20 100 g per 100 ml of aqueous γ -globulin solution.

Among the auxiliary stabilizers used in this
invention, the neutral inorganic acid salts include, for
example, the halide of alkali metals or alkaline earth
metals such as sodium chloride, potassium chloride, and
25 magnesium chloride. Their amount to be added is preferably
0.1 to 10 g per 100 ml of aqueous γ -globulin solution.

Examples of the neutral amino acids (usually,
monoaminomonocarboxylic acids) include glycine, alanine,

1 valine, leucine, and isoleucine. Their amount to be added is preferably 1 to 20 g per 100 ml of aqueous γ -globulin solution.

The organic carboxylic acid referred to in this invention is a compound comprising a hydrocarbon residue and a carboxyl substitute attached thereto. The hydrocarbon residue may be either saturated or unsaturated, and either chain-like (straight chain or branched chain) or cyclic. Examples of the hydrocarbon residue include an alkyl group and an aryl group (such as a phenyl group).

5

10 The number of carboxyl groups in said organic carboxylic acid may be plural, but is preferably one or two. Further, said organic carboxylic acid may have a hydroxyl group. The organic acid has preferably about 3 to about 15 carbon atoms.

15 The kind of the salts of the organic carboxylic acids is not particularly restricted so long as it is physiologically acceptable. Preferred examples thereof include alkali metal salts such as sodium salts and potassium salts and alkaline earth metal salts such as calcium salts. Particularly preferable are sodium salts and potassium salts. The specific examples of the organic acid salts include particularly alkali metal salts (sodium or potassium salt) of propanoic, butanoic, pentanoic, caprylic, caproic, malonic, succinic, glutaric, adipic, citric and mandelic acid. The amount of the organic carboxylic acid salt to be added is 1 to 30 g per 100 ml of the aqueous γ -globulin solution.

20

25

Examples of the surface active agents usable in

1 this invention include nonionic surface active agents
such as alkylphenyl-polyoxyethylene having a molecular
weight of 500 to 1,000 [for example, Triton (a registered
trade mark) and Nonidet (a registered trade mark)],
5 anionic surface active agents such as bile acid salts,
for example sodium taurocholate, cationic surface active
agents such as benzalkonium chloride, and polyhydric
alcohols having surface activity such as a high molecular
weight copolymer of propylene oxide having a molecular
10 weight of 2,000 to 12,000 [for example, Pluronic (a
registered trade mark) F68]. Their amount to be added
is preferably about 0.002 to about 0.05 g per 100 ml of
the aqueous γ -globulin solution.

The heat treatment should be conducted at a
15 sufficient temperature and for a sufficient time for
inactivating contaminating viruses only. For example,
it is conducted at 50 to 70°C, preferably at about 60°C,
for 5 to 20 hours, preferably for 10 hours.

In order to examine the effect of the heat
20 treatment according to this invention, the effect of
heating in the presence of a principal stabilizer and that
in the absence of the principal stabilizer were tested in
the following manner on the infectivity of various viruses
whose possible presence in γ -globulin preparations is
25 apprehended. Thus, smallpox viruses, parotitis viruses,
measles viruses, vesicular viruses, chikungunya viruses,
polioviruses, coxsackie viruses, or echoviruses were added
to a γ -globulin solution specimen, the resulting mixture

1 was heat-treated at 60°C for 10 hours, and the remaining
infectivity of the viruses was determined with the lapse
of time. The infectivity was found to have had vanished
completely after 10 hours irrespective of the presence
5 or the absence of the stabilizer. The result suggests
that other viruses than those used above will lose their
infectivity when heat-treated according to this invention.

After the above-mentioned heat treatment in the
presence of the principal stabilizer according to this
10 invention, the resulting product is examined for its
appearance and properties and further subjected to the
quantitative determination of dimer or polymer of γ -
globulin, the determination of anticomplement activity,
the determination of measles antibody titer, and the
15 acute toxicity test. The results obtained reveal as dis-
closed in the Example below, the decrease of the dimer
or polymer and anticomplement activity of γ -globulin,
but the remaining of the antibody titer, showing that
it gives a γ -globulin preparation exhibiting an extremely
20 high safety and a high effectiveness in medical treatment.

The product thus obtained is in a liquid state,
and is dispensed, as it is when a highly purified γ -
globulin has been used as the starting material and after
treated according to a known method of purification fol-
25 lowed, as required, by dialysis or sterile filtration
when it has been derived from a crude product, so as to
contain 50 to 10,000 mg of γ -globulin depending on package
units. The method of its storage is not particularly

1 restricted so long as a high temperature is avoided.
However, it is particularly preferably stored at a temperature not higher than 30°C or, as desired, may be made into a lyophilized preparation.

5 The γ -globulin thus treated is then administered as it is or after a preparation treatment known per se, for example after being diluted by or dissolved in or dialyzed against distilled water which may be for injection use. The usual dosage is 2,500 to 5,000 mg/kg body weight in
10 terms of γ -globulin per one time for adults and 100 to 150 mg/kg body weight in terms of γ -globulin per one time for infants.

The present invention is further explained by the following Examples, but it is not limited thereto.

15 In the Examples, in terms of the appearance, absorbance, O.D. 600 nm, was determined since turbidity becomes a problem.

The quantity of the dimer or the polymer was determined by means of high performance liquid chromatography.
20

The anticomplement activity was determined according to the method of Kabatt and Meyer [Experimental Immunochemistry, 225 (1961)] and the method of Nishioka and Okada [Men'eki no Seikagaku (Biochemistry of immunity)
25 103, (1971); published by Kyoritsu Shuppan Co.]. Namely, a specimen was added to 100 units of complement and the number of units remaining in the resulting mixture was determined. The anticomplement activity were expressed

1 in terms of the decreased units.

The measles antibody titer was determined by hemagglutination inhibition test and expressed in terms of international units (IU/150 mg).

5 Example 1

Experiments were made to confirm the stabilizing effect according to this invention. The experiments were conducted with samples prepared by adjusting a solution of a γ -globulin containing about 30% of polymer to a
10 concentration of 5%. After the addition of various principal stabilizers (the amount added being indicated in the Table 1), the sample was heat-treated at 60°C for 10 hours and then examined for the turbidity (O.D. 600 nm) of the solution, the quantity of polymer and the anti-
15 complement activity. The results obtained revealed that the stability of γ -globulin in heating was improved by the addition of stabilizer (Table 1).

Further, the decrease of amount of polymer, particularly dimer, was confirmed.

Table 1

| Stabilizer | Amount added *1 | O.D. 600 nm | Polymer (%) | | Anticomplement activity (unit) |
|--------------------------|-----------------|-------------|-------------|---------|--------------------------------|
| | | | Dimer | Polymer | |
| Control (before heating) | - | 0.024 | 33 | 2 | 54 |
| None (for comparison) | - | Turbid | *2 | - | - |
| Glucose | 50 | 0.010 | 15 | 2 | 38 |
| Sucrose | 50 | 0.012 | 13 | 2 | 36 |
| Manitol | 20 | 0.017 | 17 | 2 | 42 |

Note: *1: Amount (g) per 100 ml of 5% (w/v) γ -globulin solution

*2: So much as cannot be determined.

0196761

1 Example 2

Glucose was added in various concentrations to a γ -globulin solution containing about 20% (w/v) of polymer and the concentration of γ -globulin in the resulting mixture was adjusted to 5% (w/v). The solution thus obtained was heat-treated at 60°C, and the value of O.D. 600 nm, the quantity of polymer, the anticomplement activity, and the measles antibody titer were determined with the lapse of time.

10 The system containing no glucose became turbid within one hour, showing the occurrence of denaturation. The systems containing added glucose showed increasing stability of γ -globulin with increasing amount of glucose added. The system to which 100 g of glucose had been added did not become turbid and showed no decrease in the measles antibody titer even after heated at 60°C for 10 hours. Further, the content of dimer decreased down to only 10% and the anticomplement activity also decreased down to 19 units (Table 2).

0196761

Table 2 Heat treatment at 60°C for 10 hours

| Amount of glucose added (g) | O.D. 600 nm | Polymer (%) | | Anticomplement activity (unit) | Measles antibody titer (IU) |
|--------------------------------|----------------|-------------|---------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | Dimer | Polymer | | |
| Control (before heating) | 0.024 | 22 | 3 | 54 | 42 |
| None | Turbid | *1 | - | - | - |
| 5 | Turbid | - | - | - | - |
| 25 | 0.040 | 15 | 30 | >50 | <10.5 |
| 50 | 0.010 | 13 | 3 | 36 | 21 |
| 75 | 0.004 | 12 | 2 | 28 | 40 |
| 100 | 0.004 | 10 | 2 | 19 | 40 |

Note: *1: So much as cannot be determined.

1 Example 3

0196761

In addition to the principal stabilizer, glucose, one or two auxiliary stabilizers selected from a neutral amino acid (glycine), a neutral salt (sodium chloride),
5 an organic carboxylic acid salt (sodium citrate), and a surface active agent (Pluronic® F68), were added to a γ -globulin solution and the stability of γ -globulin in the resulting solution in heat treatment at 60°C for 10 hrs was examined. The test was conducted with a γ -globulin
10 solution same as in Example 1 but containing about 15% (w/v) of polymer.

Heat treatment at 60°C for 10 hours was conducted for each of the systems to which 75 g of glucose was added in common per 100 ml of γ -globulin solution and 5.8% (w/v)
15 of sodium chloride, 5% (w/v) of glycine, 10% (w/v) of sodium citrate, 0.01% (w/v) of Pluronic® F68, or a combination of two auxiliary stabilizers, 5.8% (w/v) of sodium chloride and 0.01% (w/v) of Pluronic® F68, was added. The results obtained are shown in Table 3. The results
20 reveal that the content of polymer and the anticomplement activity can be further decreased by the addition of the auxiliary stabilizers.

0196761

Table 3

| Auxiliary stabiliser (Referred to in Example 4) | Amount added (g) | O.D. 600 nm | Polymer (%) | | Anti- complement activity (unit) | Measles antibody titer (IU) |
|---|------------------------|----------------|-------------|---------|---|--------------------------------------|
| | | | Dimer | Polymer | | |
| Control (before heating) | - | 0.004 | 15 | 2 | 44 | 42 |
| None (A) | - | 0.004 | 8 | 1 | 28 | 40 |
| Sodium chloride (B) | 5.8 | 0.004 | 5 | 1 | 18 | 42 |
| Glycine (C) | 5 | 0.006 | 8 | 2 | 25 | 45 |
| Sodium citrate (D) | 10 | 0.004 | 8 | 1 | 24 | 38 |
| Pluronic® F68 (E) | 0.01 | 0.004 | 6 | 1 | 13 | 40 |
| Sodium chloride Pluronic® F68 (F) | 5.8 0.01 | 0.004 | 6 | 1 | 12 | 41 |

0196761

1 Example 4

Acute toxicity tests were conducted by way of a safety test.

Samples A, B, C, D, E and F which had been heat-
5 treated at 60°C for 10 hours in Example 3 were dialyzed
thoroughly against sterile physiological saline, and then
administered respectively to mice in groups of five
through the tail vein in a total amount of 0.5 ml and 1.0
ml per one animal. No abnormality was found after 7 days
10 of observation.

CLAIMS:-

0196761

1. A method of a virus-inactivating heat treatment of an aqueous γ -globulin solution, comprising adding to the aqueous solution an amount sufficient for stabilizing γ -globulin therein of at least one stabilizer selected
5 from the group consisting of a monosaccharide, a disaccharide and a sugaralcohol, and heating the aqueous solution at a temperature of 50° to 70°C for a period sufficient substantially to free the aqueous γ -globulin solution from infectivity of a virus.
- 10 2. The method of Claim 1, wherein the aqueous solution contains 0.1 to 30% (w/v) of γ -globulin in terms of protein.
3. The method of Claim 1, wherein the aqueous solution has a pH of 4.5 to 10.
- 15 4. The method of Claim 1 or 2, wherein the amount of the stabilizer is 10 to 100 g per 100 ml of the solution.
5. The method of Claim 4, wherein the amount of the stabilizer is 40 to 100 g per 100 ml of the solution.
6. The method of any preceding Claim, wherein in addition to
20 the stabilizer, an amount effective for decreasing anti-complement activity as compared with the use of the stabilizer alone, of at least one auxiliary stabilizer selected from the group consisting of a neutral amino acid, a neutral inorganic acid salt, an organic carboxylic
25 acid having 3 to 10 carbon atoms and a surface active agent is added to the aqueous solution.
7. The method of Claim 6, wherein the amount of the neutral amino acid is 1-20 g per 100 ml of the solution.

8. The method of Claim 6, wherein the amount of organic carboxylic acid is 1-30 g per 100 ml of the solution.

9. The method of Claim 6, wherein the amount of
5 the inorganic acid salt is 0.1 to 10 g per 100 ml of the solution.

10. The method of Claim 6, wherein the amount of the surface active agent is 0.002 to 0.05 g per 100 ml of the solution.

⑫

EUROPEAN PATENT APPLICATION

⑰ Application number: **86301196.1**

⑸ Int. Cl.: **A 61 L 2/04**

⑱ Date of filing: **20.02.86**

⑳ Priority: **21.02.85 JP 33335/85**

⑴ Applicant: **THE GREEN CROSS CORPORATION, 15-1, Imabashi-1-chome Higashi-ku Osaka-shi, Osaka 541 (JP)**

④③ Date of publication of application: **08.10.86**
Bulletin 86/41

⑴ Inventor: **Hirao, Yutaka, 14-1-606, Terauchi-2-chome, Toyonaka-shi (JP)**
Inventor: **Uriyu, Katuhiro, 601-32, Nakatsumichi-3-chome, Daifuku Sakurai-shi (JP)**
Inventor: **Uemura, Yahiro, Mezon Hirakata 215 5-18, Mitsuyacho, Hirakata-shi (JP)**

④④ Designated Contracting States: **BE CH DE FR GB LI NL SE**

④⑧ Date of deferred publication of search report: **22.10.86 Bulletin 86/43**

⑴ Representative: **Harrison, David Christopher et al, MEWBURN ELLIS & CO 2/3 Cursitor Street, London EC4A 1BQ (GB)**

④④ **Method of virus-inactivating heat treatment of gamma-globulin.**

④⑦ A gamma-globulin aqueous solution can be subjected to sterile heat-treatment without losing its activity when the treatment is conducted in the presence of at least one stabilizer which is a monosaccharide, disaccharide or sugar-alcohol added to the solution. The stabilizer serves to decrease the harmful polymer or anticomplement activity of the gamma-globulin before the treatment but to maintain the titer of a wide variety of antibodies to various viruses and bacteria, while the infectivity of viruses possibly contained is completely removed.

An additional stabilizer, which is a neutral amino, a neutral inorganic salt, an organic carboxylic acid salt or a surface active agent, assists the abovementioned stabilizer when used together with it.

EP 0 196 761 A3



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

0196761

Application number

EP 86 30 1196

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|---|---|--|---|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.4) |
| X | EP-A-0 124 506 (IMMUNO) * Claims 1,6,9,10; page 21, example 16 * | 1-9 | A 61 L 2/04 |
| X | --- EP-A-0 035 204 (CUTTER) * Page 11, lines 12-18; page 16, example 2; claims 1,2,10 * | 1-7 | |
| A | --- EP-A-0 131 740 (NEW YORK BLOOD CENTER) * Claims 14,22,23 * | 1 | |
| A | --- EP-A-0 037 078 (GREEN CROSS) | 6 | |
| A | --- EP-A-0 077 870 (GREEN CROSS) ----- | 6 | |
| The present search report has been drawn up for all claims | | | TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.4) |
| | | | A 61 L A 61 K |
| Place of search THE HAGUE | | Date of completion of the search 24-06-1986 | Examiner PELTRE CHR. |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS | | | |
| X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document | | T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document | |